(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0109285
(43) 공개일자 2018년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 9/06* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0038663
(22) 출원일자 2017년03월27일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김국성
대전광역시 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대흥동, 센트럴자이)
박수옥
대전광역시 대덕구 대덕대로 1555, 101동 602호 (석봉동, 금강엑슬루타워)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

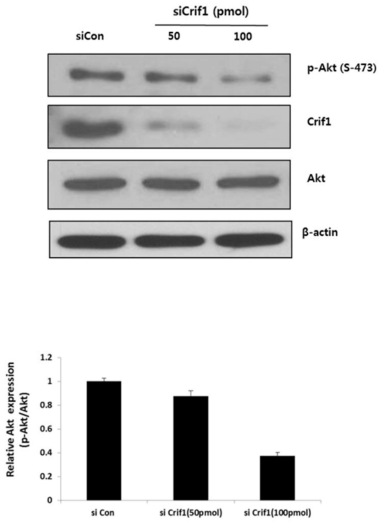
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **CRIF1을 함유하는 상처 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 세포의 이동를 촉진하는 것에 의해 상처의 초기 치료 속도를 증가시켜 상처 치료에 효과적인 상처 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CRIF1(CR6 interacting factor 1) 단백질을 유효성분으로 하는 상처 치료용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61K 9/08 (2013.01)
(72) 발명자
김선희
인천광역시 서구 서곶로 818, 제116동 501호 (당하동, 영남탑스빌아파트)

최수정
서울특별시 강서구 초록마을로32길 11, 101호 (화곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구지원사업
연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교의과대학
연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01061516
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구지원사업
연구과제명 혈관내피세포 미토콘드리아 기능장애에 의한 동맥경화증 발병기전 규명
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교의과대학
연구기간 2015.07.01 ~ 2018.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

CRIF1(CR6 interacting factor 1) 단백질을 유효성분으로 하는 상처 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

CRIF1(CR6 interacting factor 1) 단백질은 CRIF1을 암호화하는 유전자의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 상처 치료용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유전자는 발현 벡터 내에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 상처 치료용 조성물.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 상처 치유 과정 중 염증단계와 증식단계를 촉진시켜 상처의 초기 치료 속도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 상처 치료용 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 피부 외용제 또는 주사제의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 상처 치료용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 피부 외용제는 액제, 연고제, 크림제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 겔제 또는 에어로졸제인 것을 특징으로 하는 상처 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포의 이동을 촉진하는 것에 의해 상처의 초기 치료 속도를 증가시켜 상처 치료에 효과적인 상처 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 상처는 외부의 압력에 의하여 외부 또는 조직의 연속성이 파괴되거나, 일부 영역에 결손이 생기는 상태이다. 상처를 입는 경우 통증, 출혈, 기능장애, 염증의 증상을 나타낼 수 있으며, 생체는 이에 반응하여 원래의 상태

를 빨리 회복하려고 한다. 상처의 치유란 '세포가 재생, 분화, 증식되어 잃어버렸던 연속성을 다시 유지하는 것'으로 정의할 수 있다. 이러한 상처의 치유과정은 크게 염증단계, 증식단계, 재구성단계를 거치는 것으로 알려져 있다.

[0003] 염증단계는 상처 부위의 혈액이 응고되어 지혈이 이루어지는 한편, 백혈구와 호중구를 비롯한 면역세포들이 해당 부위로 이동하여 외부로부터 유입된 위해물질 및 손상된 조직을 면역반응에 의해 제거하는 단계이다. 본 단계에서의 혈액의 응고는 노출된 조직들을 보호하고, 상처 치유과정 동안 세포들이 이동할 수 있는 기반을 제공한다. 증식단계에는 혈관내피세포가 상처 부위로 이동하여 손상된 조직 내로 새로운 혈관이 형성되며, 콜라겐이나 엘라스틴과 같은 조직구성 단백질이 생성되는 동시에 섬유아세포가 상처부위로 이동하여 육아조직을 형성한다. 또한 상처 주변의 피부와 조직이 수축되고 상처의 주변부로부터 상피세포가 증식되면서 상처 부위의 크기가 감소하게 된다. 재구성단계는 증식된 상피세포들이 성숙해지고, 섬유조직의 형성에 의해 새로 합성된 조직과 증식된 세포들간의 접합력과 탄력성이 증가되는 상처 치유과정의 최종 단계이다.

[0004] 세포의 이동은 동물의 성장 및 생리 활동을 위해 필수적인 중요한 과정으로, 전술한 바와 같이 상처 치유의 각 단계에서 각종 세포의 이동이 중요한 역할을 담당한다. 이에 세포의 이동을 촉진하는 조성물들이 상처의 빠른 치유를 위한 상처 치료용 조성물로 개발되고 있다. 그 예로 등록특허 10-1068442호는 리그난계의 화합물, 그의 유사체 또는 그들의 염이 세포이동 촉진 효과가 뛰어나기 때문에 조직재생, 상처치료에 유용하게 사용될 수 있음을 보고하였다. 각질형성세포주의 세포 이동 및 콜라겐 증식을 유도하는 엔케팔린 변이체에 관한 등록특허 10-1688696호, 와 세포의 증식 및 이동에 효과적인 해조류 추출물에 대한 공개특허 10-2015-0135743호 역시 상처 치료에 효과적임을 보고하였다.

[0005] CRIF1(CR6 interacting factor 1)은 미토콘드리아에 존재하는 단백질로 CRIF1의 결핍은 미토콘드리아의 기능장애를 유도하고, ROS 생성을 자극하는 것으로 알려져 있다. 공개특허 10-2016-0022628호는 CRIF1의 결핍은 내피세포 기능장애와 혈관 염증을 유발시켜, 내피세포 기능장애 및 혈관 염증과 관련된 혈관질환의 진단 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있음을 보고하였다. 공개특허 10-2009-0103763호는 CRIF1 단백질이 C-말단에 존재하는 cc-도메인을 통한 geminin의 기능조절을 통하여 DNA의 비정상적인 복제를 제어하는 것에 의해 암에 대한 치료효과가 있음을 보고하였다.

[0006] 그러나, CRIF1이 세포의 이동에 영향을 미치거나, 상처의 치료와 관련된 요소들에 영향을 미친다는 것에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 등록특허 10-1068442호

(특허문헌 0002) 등록특허 10-1688696호

(특허문헌 0003) 공개특허 10-2015-0135743호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 세포의 이동을 촉진하는 것에 의해 상처의 치유과정을 촉진할 수 있는 상처 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 CRIF1(CR6 interacting factor 1) 단백질을 유효성분으로 하는 상처 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0010] siRNA를 이용하여 CRIF1 넉다운에 의해 세포 내 CRIF1의 발현 수준을 조절하면, CRIF1의 발현 억제 정도에 따라 종래 혈관내피세포의 혈관 증식 및 섬유아세포의 증식에 영향을 주는 것으로 알려진 Akt 인산화가 억제됨을 확인할 수 있었다. 이는 CRIF1이 유도하여 상처 치유과정에 중요한 역할을 하는 혈관의 신생 및 섬유아세포 증식

에 효과가 있음을 의미한다. 또한, CRIF1의 발현 수준에 따라 종래 세포 이동을 조절하는 것으로 알려진 Rho GDI2의 발현을 조절하는 것을 확인하였다. 추가적으로 상처 회복능 평가에서도 CRIF1이 세포 이동성을 증가시키는 것을 보여주었다. 이러한 CRIF1의 Akt 활성화나 세포의 이동 촉진 효능은 상처 치유과정 중 염증단계와 증식단계를 촉진시켜 상처의 초기 치료속도를 증가시키는 역할을 하므로 상처 치료, 특히 상처의 초기 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0011] 본 발명에서 상기 CRIF1 단백질은 CRIF1을 암호화하는 유전자의 형태로 제공될 수 있다. 상기 유전자는 DNA, RNA, PNA 및 이들의 유도체를 포함한다. 상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로, 상기 발현벡터를 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 감염 또는 형질도입하여 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있다.

[0012] 본 발명의 상처 치료용 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 다양한 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 예를 들면, 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 시럽, 에멀전과 같은 경구형 제형이나, 외용제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 조성물은 상처 치료의 목적을 고려하면, 국소 투여가 가능한 피부 외용제 또는 주사제의 형태인 것이 더욱 바람직하다. 상기 피부 외용제의 형태로는 액제, 연고제, 크림제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 겔제, 에어로졸제 등을 예로 들 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 상처의 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 예를 들면, 상처의 감염을 방지하기 위한 항생제, 항염증제, 진통제와 병용할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0013] 이상과 같이 본 발명의 CRIF1을 함유하는 조성물에 의하면 세포의 이동과 함께 Akt 인산화를 활성화하여 혈관신생과 섬유아세포의 증식에 효과적이므로 상처 치유과정을 촉진하기 때문에 상처 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 CRIF1 넉다운에 의한 Akt 인산화 저해를 보여주는 전기영동 이미지 및 정량 그래프.

도 2는 CRIF1 넉다운에 의한 Rho GDI2 발현 증가를 보여주는 전기영동 이미지 및 정량 그래프.

도 3은 CRIF1 넉다운에 의한 상처 회복능 평가 결과를 보여주는 이미지 및 정량 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0016] **[실시예]**

[0017] **실시예 1 : 세포배양 및 siRNA 감염에 의한 CRIF1 유전자의 넉다운**

[0018] HUVECs(Human umbilical vein endothelial cells)는 Clonetics(USA)로부터 구입하여, Endothelial Growth Medium-2(Lonza, USA)에서 제조사의 지시에 따라 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 2~8 계대(passages)에서 아융합(sub-confluent)의 증식성 HUVECs를 사용하였다. HUVECs는 Lipofectamine 2000(Invitrogen, USA)를 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 하기 서열번호 1, 2의 CRIF1에 대한 siRNA로 감염시켰다. 감염된 세포는 CRIF1 유전자의 넉다운(knowdown)을 위하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 48시간 배양하였다. 대조군으로는 서열번호 1과 2의 siRNA 대신 Stealth RNAi Negative Control Duplexes, Medium GC Duplex(Invitrogen)를 사용하여 감염시켰

다.

[0019] 센스 : 5'-UGGAGGCCGAAGAACGCGAAUGGUA-3' (서열번호 1)

[0020] 안티센스 : 5'-UACCAUUCGCGUUCUUCGGCCUCCA-3' (서열번호 2)

[0021] **실시예 2 : CRIF1 넉다운에 의한 Akt 인산화 저해 확인**

[0022] 혈관내피세포의 혈관 증식 및 섬유아세포의 증식에 영향을 주는 것으로 알려진 단백질인 Akt의 인산화 정도에 CRIF1이 미치는 영향을 CRIF1 넉다운에 의해 웨스턴 블랏으로 확인하였다.

[0023] 실시예 1에서 siRNA를 감염시키고 배양한 세포를 RIPA(10mM Tris-HCl at pH 8.0, 1mM EDTA, 140mM NaCl, 0.1% SDS, 0.1% 200 sodium deoxycholate, and 1% Triton X-100)와 protease inhibitor cocktail (Roche)를 사용하여 용균(lysis)하였다. 30㎍의 용균액을 SDS-PAGE에 용해시킨 후 PVDF 멤브레인으로 옮겨 당업계에서 알려진 통상의 웨스턴 블랏 방법에 의해 CRIF1, Akt 및 p-Akt 단백질을 정량하였다. 웨스턴 블랏을 위한 항체로, Anti-CRIF1, anti-phospho Akt 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서, Akt 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 분리된 단백질들의 시각화를 위해 perxosidase가 접합된 이차 항체(Santa Cruz)를 처리하고, Thermo Fisher Scientific 사의 Super Signal West Pico 또는 Femto Substrate를 사용하여 화학발광 신호를 현상하였다. 현상된 블랏과 밴드의 밀도는 Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 Gel Doc 2000 Chemi Doc system으로 정량하였다.

[0024] 도 1은 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 전기영동 이미지와 정량 그래프로 siRNA의 감염에 의해 CRIF1의 발현이 감소함에 따라 농도 의존적으로 Akt 인산화 과정 역시 저해됨을 보여준다. 이로부터 CRIF1은 Akt 인산화를 활성화하여 혈관 신생 및 섬유아세포의 증식을 촉진함을 확인하였다.

[0025] **실시예 3 : CRIF1 넉다운에 의한 Rho GDI2의 발현 수준 평가**

[0026] Rho GDI2는 세포의 이동을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에 CRIF1의 넉다운이 Rho GDI2의 발현에 영향을 미치는 지 웨스턴 블랏에 의해 확인하였다. 웨스턴 블랏은 실시예 2와 동일한 방법으로 실시하였으며, 항체로는 anti-Rho GDI2 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다.

[0027] 도 2는 웨스텃 블랏 결과를 보여주는 전기영동 사진 및 정량 그래프이다. 도 2로부터 CRIF1은 Rho GDI2의 발현을 조절하는 것에 의해 세포의 이동성을 조절할 수 있음을 보여준다.

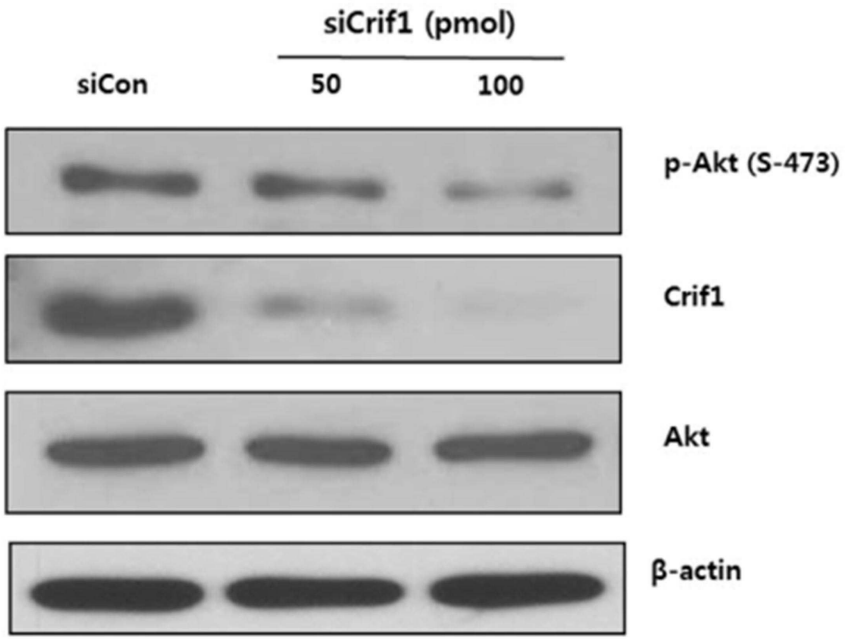
[0028] **실시예 4 : 상처 회복능 평가(Wound healing assay)**

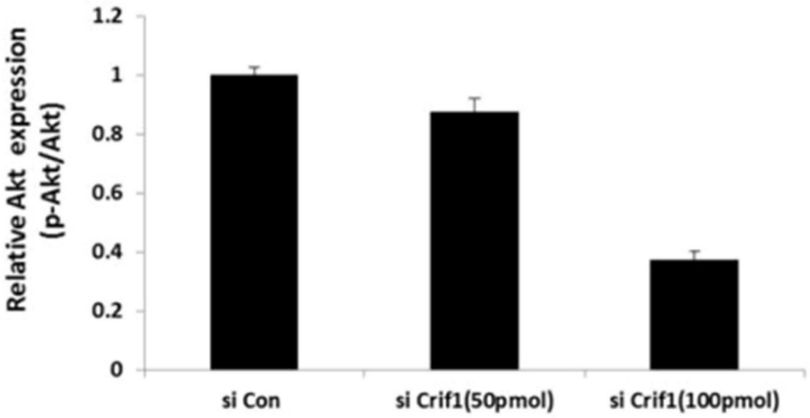
[0029] HUVECs를 6-웰 플레이트에서 실시예 1에 기재된 방법에 따라 배양하고, CRIF1에 대한 siRNA로 감염시켰다. 이후 24시간 추가로 배양하고, 융합된 세포 단층에 살균된 200 ㎕ 피펫 팁을 사용하여 일정한 넓이로 상처를 내고, 잔해를 PBS를 사용하여 세척하였다. 이후 추가로 48시간 배양하고 배양 전·후의 사진으로부터 Image J software를 사용하여 상처 부위의 세포의 이동 거리를 측정하는 것에 의해 상처 회복능을 평가하였다.

[0030] 도 3은 상처 회복능 평가 실험의 현미경 이미지와 상처 회복능을 정량화한 그래프이다. 도 3은 CRIF1을 넉다운시킨 경우 대조군에 비해 상처 회복능이 크게 감소하는 것을 보여주며, 이로부터 CRIF1의 발현이 억제되면 세포의 이동성이 저하됨을 알 수 있었다. 이는 실시예 3의 세포의 이동성을 억제하는 Rho GDI2의 발현이 증가한 것과 일치하는 것으로, CRIF1이 Rho GDI2의 발현을 조절하는 것에 의해 세포의 이동성에 영향을 주는 것을 시사한다.

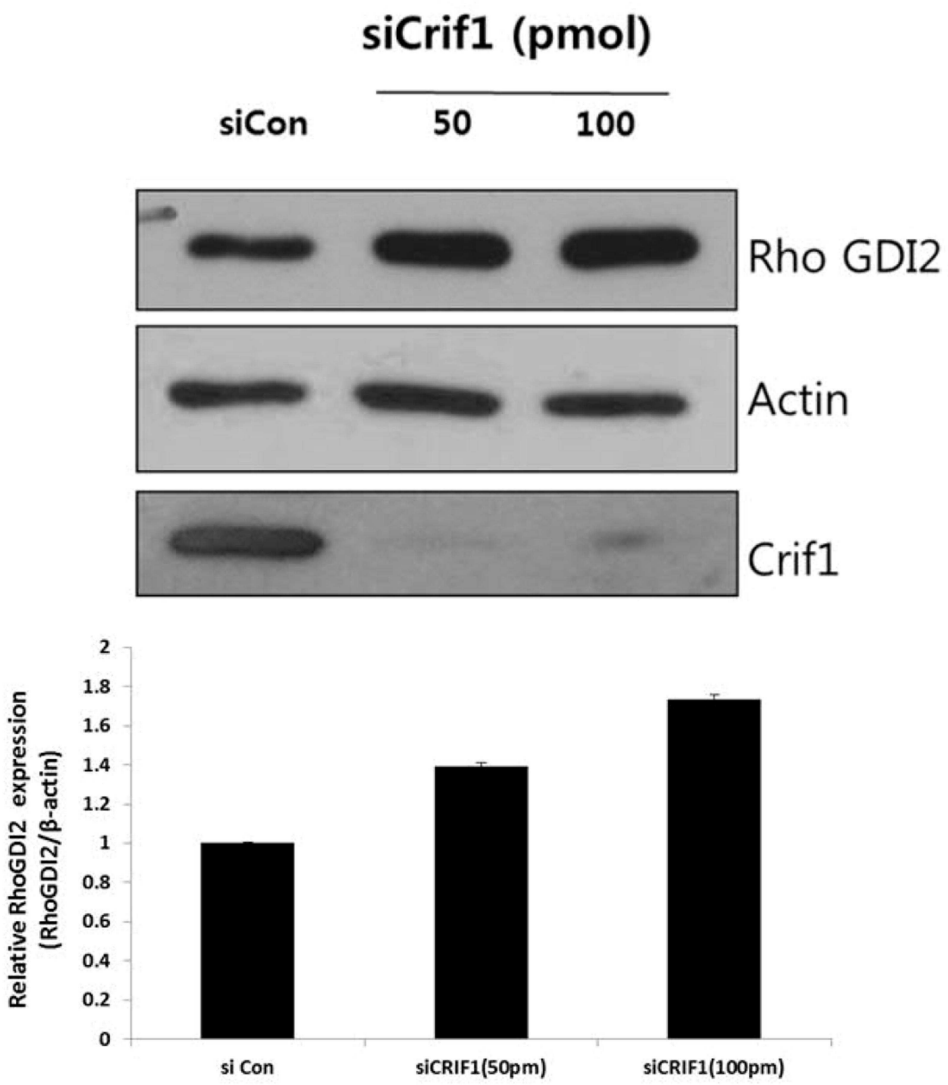
도면

도면1

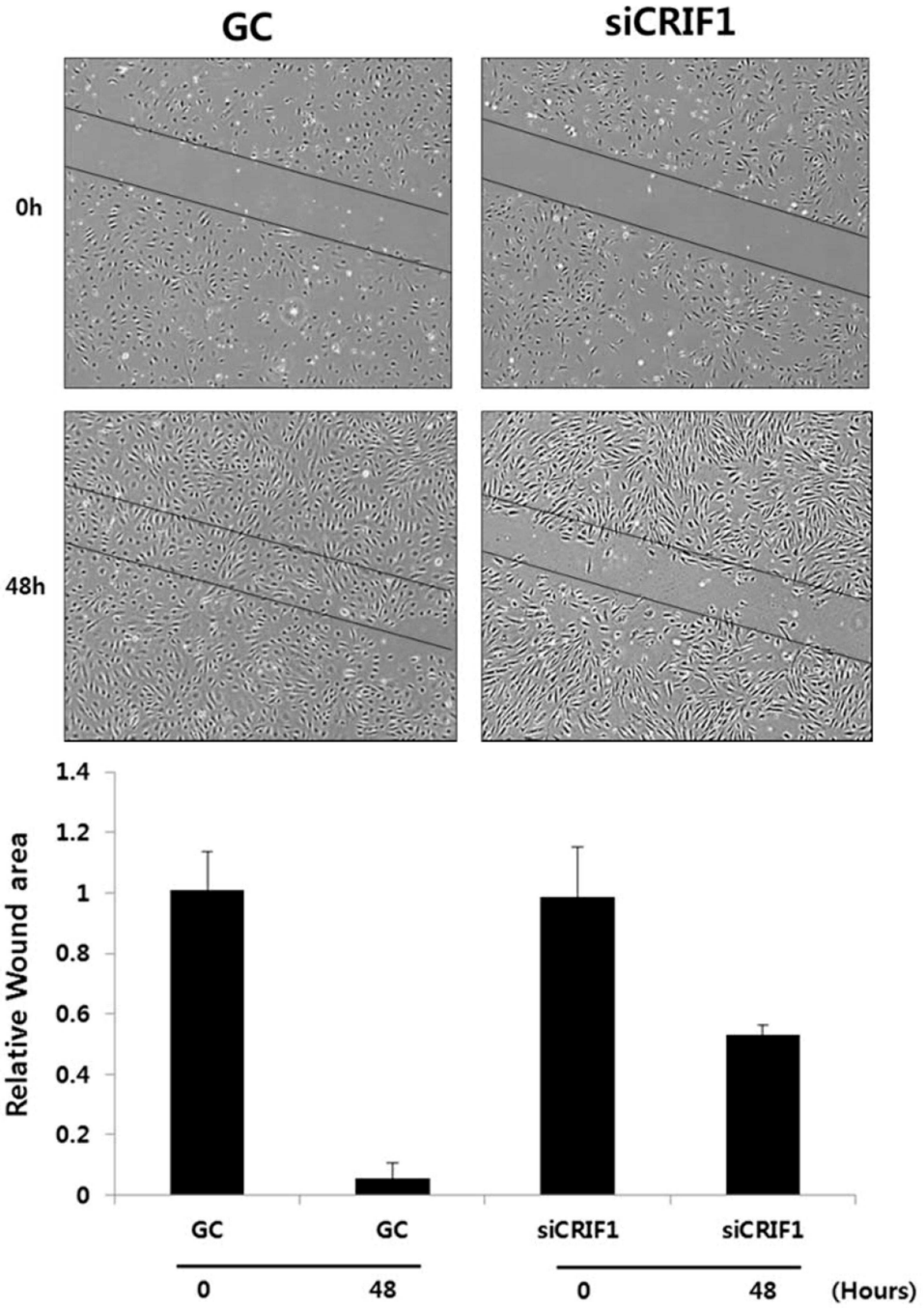

siCrif1 (pmol)
siCon
50
100
p-Akt (S-473)
Crif1
Akt
β-actin


Relative Akt expression
(p-Akt/Akt)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
si Con
si Crif1(50pmol)
si Crif1(100pmol)

도면2


siCrif1 (pmol)
siCon
50
100
Rho GDI2
Actin
Crif1
Relative RhoGDI2 expression
(RhoGDI2/β-actin)
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
si Con
siCRIF1(50pm)
siCRIF1(100pm)

도면3



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for Wound Healing Comprising CRIF1

<130> P0317-237

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense siRNA for CRIF1

<400> 1

uggaggccga agaacgcgaa uggua 25

<210> 2

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense siRNA for CRIF1

<400> 2

uaccauucgc guucuucggc cucca 25